

THESIS
BONN

1969

Charakterisierung und Kinetik einer 17β -Hydroxysteroid:
NAD(P)-Oxydoreduktase im Serum der schwangeren Frau

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Walther Markus Meusers
aus
Viersen

Bonn 1969



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Charakterisierung und Kinetik einer 17β -Hydroxysteroid:
NAD(P)-Oxydoreduktase im Serum der schwangeren Frau

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Walther Markus Meusers
aus
Viersen

Bonn 1969

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

Referent: Professor Dr. rer. nat. H. Breuer

Tag der mündlichen Prüfung: 8.7.1969

Aus dem Institut für Klinische Biochemie Bonn-Venusberg
Direktor: Professor Dr. rer. nat. H. Breuer

I N H A L T

	<u>Seite</u>
Literaturverzeichnis	4
Einleitung	8
Methodik	10
Steroide	10
Reagenzien, Lösungsmittel und Puffer	10
Gewinnung des Serums	11
Inkubationsbedingungen	11
Aufarbeitung der Versuchsansätze	11
Fällung mit Ammoniumsulfat	11
Papierchromatographie	12
Quantitative Bestimmung	12
Ergebnisse	14
Nachweis einer 17 β -Hydroxysteroid:NAD(P)- Oxydoreduktase	14
Kinetische Untersuchungen	14
Untersuchungen zur Substratspezifität	22
Versuche zur Aktivierung und Inaktivierung	23
Fällung des Enzyms mit Ammoniumsulfat	28
Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase während der Schwangerschaft und unter der Geburt	28
Diskussion	32
Zusammenfassung	36

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- (1) H. Breuer
in: Hoppe-Seyler/Thierfelder
Handbuch der physiolog.- und pathol.-chem. Analyse,
10. Auflage, Springer 1964
- (2) M.L. Sweat, L.T. Samuels und R. Lumry
J. biol. Chemistry 185, 75 (1950)
- (3) C.A. Villee und J.M. Spencer
J. biol. Chemistry 235, 3615 (1960)
- (4) G.L. Endahl und C.D. Kochakian
Biochim. biophys. Acta 62, 245 (1962)
- (5) J. Jarabak, J.A. Adams, H.G. Williams-Ashman und
P. Talalay
J. biol. Chemistry 237, 345 (1962)
- (6) L.J. Langer und L.L. Engel
J. biol. Chemistry 233, 583 (1958)
- (7) L.J. Langer, J.A. Alexander und L.L. Engel
J. biol. Chemistry 234, 2609 (1959)
- (8) D.D. Hagerman und C.A. Villee
J. biol. Chemistry 234, 2031 (1959)
- (9) P. Talalay
persönliche Mitteilung

- (10) K. Dahm und H. Breuer
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 336, 63 (1964)
- (11) H. Breuer und K. Dahm
Biochim. biophys. Acta 85, 29 (1964)
- (12) H. Breuer und K. Dahm
Acta endocrin, 45, 47 (1964)
- (13) K. Repke und F. Markwardt
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. 223, 271 (1954)
- (14) F. Bishoff, A. Torres und G. Lopez
Amer. J. Physiol. 189, 447 (1957)
- (15) H.J. Portius und K. Repke
Naturwissenschaften 47, 43 (1960)
- (16) H.J. Portius und K. Repke
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. 239, 184 (1960)
- (17) B.T. Brown, W.S. Golder und S.E. Wright
Austral. J. Exper. Biol. 39, 345 (1961)
- (18) H. Breuer
Arzneimittel-Forsch., Aulendorf 9, 667 (1959)
- (19) H.J. Portius und K. Repke
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. 239, 299 (1960)
- (20) M.N. Huffman und M.H. Lott
J. biol. Chemistry 172, 325 (1948)

- (21) A. Allais und Ch. Hoffmann
U.S. Patent 2835681, C.A. 52, 18531 (1958)
- (22) O. Folin und V. Ciocalteu
J. biol. Chemistry 73, 627 (1927)
- (23) T.C. McIlvaine
J. biol. Chemistry 49, 183 (1921)
- (24) S.P.L. Sørensen
Ergebn. Physiol., biol. Chem. exp. Pharmakol. 12,
393 (1912)
- (25) G. Gomori
in: S.P. Colowick und N.O. Kaplan (Hrsg.): Methods
in Enzymology. Bd. I, S. 138. Academic Press, New
York (1955)
- (26) G.E. Delory und E.J. King
Biochem. J. 39, 245 (1945)
- (27) F.L. Mitchell und R.E. Davis
Biochem. J. 56, 690 (1954)
- (28) R. Neher
Steroid chromatography. Elsevier, Amsterdam -
London - New York (1964)
- (29) R.B. Bradstreet
The Kjeldahl Method for Organic Nitrogen. Academic
Press, New York und London (1965)
- (30) P. Talalay und P.I. Marcus
J. biol. Chemistry 218, 675 (1956)

- (31) E. Racker^{*}
J. biol. Chemistry 184, 313 (1959)

Außerdem wurden benutzt:

H. Netter
Theoretische Biochemie, Springer 1959

H. Koblet
Physikalische Begriffe in der Klinischen Biochemie
Thieme 1964

E I N L E I T U N G

Die Kenntnisse der am Östrogenstoffwechsel beteiligten Enzyme haben sich in den letzten Jahren sehr erweitert. Untersuchungen wurden in zahlreichen Organen durchgeführt, so u.a. in Leber, Niere, Placenta, Prostata, Uterus, in der Nebennierenrinde sowie in Ovarium und Testis (1). Eingehend widmeten sich mehrere Autoren den 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktasen, welche die gegenseitige Umwandlung von 17 β -Östradiol und Östron bzw. Testosteron und Androstendion katalysieren. Die erste Präparation einer 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase wurde 1950 durchgeführt für das Enzym aus der Stierleber (2). Anreicherungen aus der Leber und der Niere des Meerschweinchens folgten (3,4). JARABAK et al. reicherten 1962 eine 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase aus der Plazenta des Menschen auf das 2500fache an (5). Das Enzym wurde auch von anderen Autoren charakterisiert (6,7,8). Inzwischen gelang die Reindarstellung in kristalliner Form (9). 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktasen sind außerdem nachgewiesen und kinetisch untersucht worden in der Nebenniere und Niere der Ratte (10, 11), sowie in der Nebennierenrinde des Menschen (12). Entsprechende Untersuchungen im Blut und in den Erythrocyten des Menschen wurden wiederholt vorgenommen (13-17). Außerdem wurden unter Verwendung verschiedener Substrate weitere Enzyme des Östrogenstoffwechsels in den roten Blutkörperchen gefunden (18, 19).

Die offenbar weite Verbreitung der 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktasen wirft die Frage auf, ob Enzyme aus dem Steroidstoffwechsel auch im Serum des Menschen erscheinen. Eine solche Untersuchung erscheint nicht zuletzt deshalb

gerechtfertigt, weil die Enzymdiagnostik zunehmend an Bedeutung gewinnt. Nach praktisch-klinischen Gesichtspunkten werden Sekretenzyme mit ihrer Funktion außerhalb der Herkunftszelle unterschieden von den Zellenzymen, die extrazellulär funktionslos sind. Die meisten Zellenzyme, deren Bestimmung im Serum diagnostisch wertvoll ist, gehören den Grundstoffwechsel-Ketten an. Zur Organdiagnose ist daher die Bestimmung des Enzym-Musters erforderlich, sofern sich keine organspezifischen Enzyme nachweisen lassen.

Enzyme aus dem Steroidstoffwechsel sind bisher im Serum noch nicht nachgewiesen worden. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß im Serum der schwangeren Frau eine 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase vorkommt, die streng substratspezifisch ist und sowohl mit NAD^+ als auch mit NADP^+ reagiert und deren Aktivität vom 3. bis zum 10. Schwangerschaftsmonat um etwa das 10fache ansteigt. Das Verhalten der Enzymaktivität post partum sowie die kinetischen Werte werden mitgeteilt.

M E T H O D I K

Steroide

[4-¹⁴C]Östron [Östra-1.3.5(10)-trien-3-ol-17-on]

(spez. Aktivität 29,5 mC/mMol)

[4-¹⁴C]17β-Östradiol [Östra-1.3.5(10)-trien-3.17β-diol]

(spez. Aktivität 31,8 mC/mMol)

[4-¹⁴C]Östriol [Östra-1.3.5(10)-trien-3.16α.17β-triol]

(spez. Aktivität 29,4 mC/mMol)

[4-¹⁴C]Testosteron [Androst-4-en-17β-ol-3-on]

(spez. Aktivität 29,2 mC/mMol)

[4-¹⁴C]Δ⁴-Androstendion [Androst-4-en-3.17-dion]

(spez. Aktivität 28,5 mC/mMol)

[4-¹⁴C]Dehydroepiandrosteron [Androst-5-en-3β-ol-17-on]

(spez. Aktivität 27,2 mC/mMol)

wurden vom Radiochemical Centre, Amersham, England, bezogen.

[4-¹⁴C]16-Oxo-17β-Östradiol [Östra-1.3.5(10)-trien-3.17β-diol-16-on]

(spez. Aktivität 0,07 mC/mMol)

wurde nach HUFFMAN und LOTT (20),

[4-¹⁴C]17α-Östradiol [Östra-1.3.5(10)-trien-3.17α-diol]

(spez. Aktivität 31,8 mC/mMol) nach (21) hergestellt.

Alle radioaktiven Steroide wurden vor den Versuchen papierchromatographisch auf Reinheit geprüft.

Reagenzien, Lösungsmittel und Puffer

Mit Ausnahme von FOLIN-CIOCALTEUS-Reagenz (22) waren alle Reagenzien von p.a. Reinheitsgrad (E. Merck, Darmstadt). Die organischen Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert.

NAD^+ , NADH , NADP^+ und NADPH wurden von Biochemica Boehringer, Mannheim, bezogen. Folgende Puffer wurden verwendet: 0,3m Citrat-Phosphat-Puffer (pH-Bereich 4,0 - 7,4) (23), 0,2m Sörensen-Phosphat-Puffer (pH-Bereich 4,0 - 7,4) (24), 0,2m Tris-HCl-Puffer (pH-Bereich 7,4 - 9,0) (25), 0,6m Carbonat-Bicarbonat-Puffer (pH-Bereich 9,0 - 10,5) (26).

Gewinnung des Serums

Zur Gewinnung des Serums wurde venöses Blut unmittelbar nach der Entnahme 10 Min. bei 1500 g zentrifugiert. Das Blut stammte von gesunden schwangeren Frauen (Durchschnittsalter 28,2 Jahre), die sich routinemäßig in der Universitäts-Frauenklinik Bonn untersuchen ließen. Die Zeit zwischen der Entnahme des Blutes und dem Beginn der Inkubationsversuche betrug 30 - 40 Min. Die verwendeten Serumproben waren weder hämolytisch, lipämisch noch ikterisch.

Inkubationsbedingungen

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Versuche bei 37° für 120 Min. in einem Schüttelthermostat unter Luft durchgeführt. Jeweils 100 nC [$4\text{-}^{14}\text{C}$] Steroid, gelöst in etwa 0,02 ml Propylenglykol, wurden mit 1,0 ml Serum in Gegenwart von 4,5 μMol NAD^+ und 2 ml 0,2m Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) inkubiert.

Aufarbeitung der Versuchsansätze

Die Inkubationslösungen wurden dreimal mit jeweils 10 ml Äther/Chloroform (3:1 v/v) extrahiert, die Extrakte vereinigt und bei 35° eingedampft. Die Extraktückstände wurden in etwa 0,5 ml Methanol aufgenommen.

Fällung mit Ammoniumsulfat

12 ml Serum wurden im Verlaufe von 20 Min. unter ständigem Rühren mit 2,9 g fein gepulvertem Ammoniumsulfat bis zur 40proz. Sättigung versetzt. Die Lösung wurde anschließend

20 Min. bei 150000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde im glycerinhaltigen Medium B (5) (pH 8,6) aufgenommen (40proz. Ammoniumsulfat-Fällung). Der Überstand der 40proz. Fällung wurde mit 1,6 g Ammoniumsulfat bis zur 60proz. Sättigung versetzt und der entstandene Niederschlag (60proz. Ammoniumsulfat-Fällung) in der oben beschriebenen Weise aufgearbeitet. Durch Zusatz von 1,7 g Ammoniumsulfat zu dem Überstand der 60proz. Fällung wurde schließlich die 80proz. Ammoniumsulfat-Fällung erhalten, die nach entsprechender Aufarbeitung wie die beiden vorausgegangenen Fällungen im glycerinhaltigen Medium B (5) gelöst wurde. Die so gewonnenen drei Ammoniumsulfat-Fällungen wurden bis zur Verwendung bei 0° aufbewahrt.

Papierchromatographie

Die Papierchromatographie erfolgte bei 25 - 27° auf formamidimprägniertem Papier (Schleicher & Schüll 2043 b Mgl) mit Monochlorbenzol oder Chloroform (zur Auftrennung der phenolischen Steroide) oder auf propylenglykolimprägniertem Papier mit Benzol/Cyclohexan (4:1 v/v) (zur Auftrennung der neutralen Steroide). Die Lokalisierung der Steroide erfolgte durch Messung der Radioaktivität und Vergleich der R_F -Werte bzw. Wanderungsgeschwindigkeiten mit denjenigen der authentischen nichtradioaktiven Referenzsubstanzen. Die phenolischen Steroide wurden mit FOLIN-CIOCALTEUS-Reagenz (27), die neutralen Steroide entweder durch UV-Kontaktphotographie oder Anfärben mit Antimontrichlorid (ges. Lösung von $SbCl_3$ in Chloroform) (28) sichtbar gemacht.

Quantitative Bestimmung

Die quantitative Bestimmung der Steroide erfolgte nach Papierchromatographie durch Auszählung der Radioaktivität auf 3 cm breiten und 50 cm langen Papierstreifen mit einem Radiopapierchromatographen der Fa. Friesecke und Höpfner (Erlangen/Bruck), ausgerüstet mit einem fenster-

losen Methan-Durchflußzähler (4π -Zählgeometrie) und einem Kompensations-Linien-Schreiber der Fa. Dr.-Ing. W. Höfler (Ettlingen/Baden) mit Integrator. Die Zählausbeute für ^{14}C betrug 14 - 15%. Die Stickstoffbestimmungen erfolgten nach KJELDAHL (29).

ERGEBNISSE

Nachweis einer 17 β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase

Nach 120 Min. Inkubation von 3,1 nMol (100 nC) [4-¹⁴C] 17 β -Östradiol mit 0,5 ml Serum (10. Schwangerschaftsmonat) und 4,5 μ Mol NAD⁺ in 3,5 ml Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) wurden 0,86 nMol [4-¹⁴C]Östron nachgewiesen; dieses entspricht einer etwa 28proz. Ausbeute. Bei Verwendung von 4,5 μ Mol NADP⁺ als Cofaktor betrug die nachgewiesene Menge 0,72 nMol [4-¹⁴C]Östron, entsprechend einer 23proz. Ausbeute. Nach Inkubation von 3,4 nMol (100 nC) [4-¹⁴C]Östron mit 0,5 ml Serum (10. Schwangerschaftsmonat) und 4,5 μ Mol NADH in 3,5 ml Citrat-Phosphat-Puffer (pH 6,0) entstanden 0,74 nMol [4-¹⁴C] 17 β -Östradiol; dies entspricht einer etwa 22proz. Ausbeute. Bei Zusatz von 4,5 μ Mol NADPH wurden 0,97 nMol [4-¹⁴C]Östron gebildet, entsprechend einer 29proz. Ausbeute. Unter den gewählten Versuchsbedingungen entstanden aus [4-¹⁴C] 17 β -Östradiol nur [4-¹⁴C]Östron und aus [4-¹⁴C]Östron nur [4-¹⁴C] 17 β -Östradiol. Die Gesamtwiederfindung der eingesetzten Radioaktivität (¹⁴C) betrug in allen Versuchen etwa 90%. Daraus geht hervor, daß weitere Reaktionen der jeweils eingesetzten Substrate oder der gebildeten Reaktionsprodukte nicht stattfanden. Die Identifizierung der Reaktionsprodukte [4-¹⁴C]Östron und [4-¹⁴C] 17 β -Östradiol erfolgte auf Grund ihres Verhaltens bei der Papierchromatographie und durch Kristallisation zur konstanten spezifischen Aktivität.

Kinetische Untersuchungen

Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, zeigt die Oxydation von [4-¹⁴C] 17 β -Östradiol ein Maximum bei einem pH-Wert von etwa 9; für die Reduktion von [4-¹⁴C]Östron wurde ein

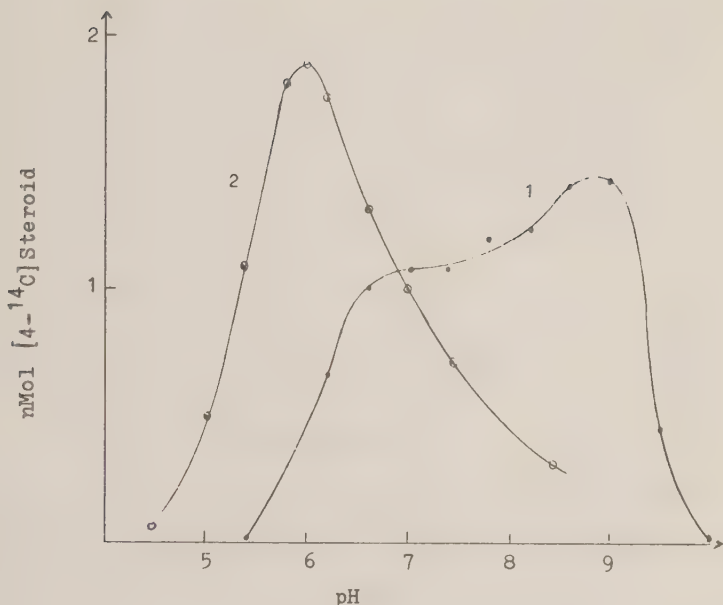


Abb. 1. Abhängigkeit der Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase im Serum der schwangeren Frau (10. Schwangerschaftsmonat) von der Wasserstoffionenkonzentration.

Kurve 1: (●—●): Jeweils 3,1 nMol (100 nC) [4-¹⁴C]17 β -Östradiol wurden mit 0,5 ml Schwangerenserum, 4,5 μ Mol NAD⁺ und 0,2m Sörensen-Phosphat-Puffer (pH-Bereich 4,0 - 7,4) bzw. 0,2m Tris-HCl-Puffer (pH-Bereich 7,4 - 9,0) bzw. 0,6m Carbonat-Bicarbonat-Puffer (pH-Bereich 9,0 - 10,5) inkubiert; es wurde die Bildung von [4-¹⁴C]Östron gemessen.

Kurve 2: (○—○): Jeweils 3,4 nMol (100 nC) [4-¹⁴C]Östron wurden mit 0,5 ml Schwangerenserum, 4,5 μ Mol NADH und 0,3m Citrat-Phosphat-Puffer (pH-Bereich 4,0 - 7,4) bzw. Tris-HCl-Puffer (pH-Bereich 7,4 - 9,0) inkubiert; es wurde die Bildung von [4-¹⁴C]17 β -Östradiol gemessen. Alle Versuche wurden in 3,5 ml 120 min. lang bei 37° durchgeführt. Die Punkte der Kurven sind Mittelwerte aus Messungen an 3 verschiedenen Serumproben.

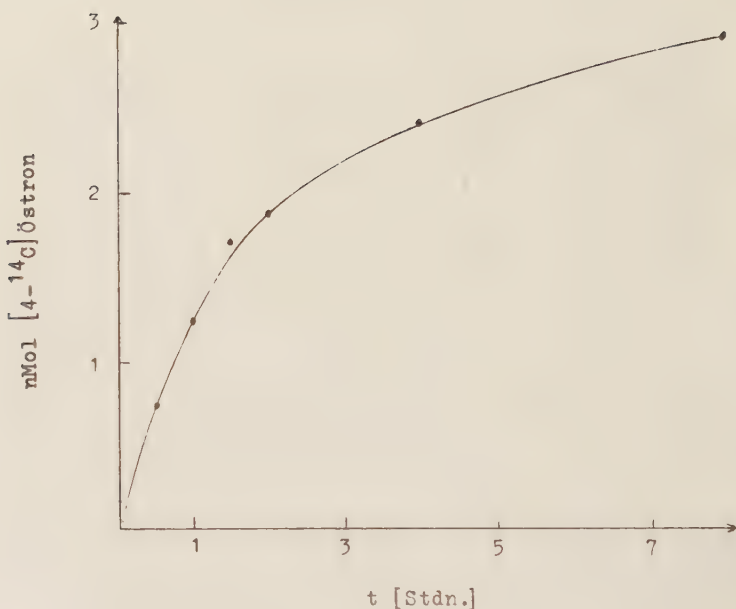


Abb. 2. Zeitlicher Verlauf der Oxydation von [4-¹⁴C]17β-Östradiol zu [4-¹⁴C]Östron durch die 17β-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase im Serum der schwangeren Frau (10. Schwangerschaftsmonat). Jeweils 3,1 nMol (100 nC) [4-¹⁴C] 17β-Östradiol wurden mit 1,0 ml Schwangerenserum, 4,5 μMol NAD⁺ und 0,2m Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) inkubiert; es wurde die Bildung von [4-¹⁴C]Östron gemessen. Alle Versuche wurden in 3,0 ml bei 37° durchgeführt. Die Punkte der Kurve sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Maximum bei einem pH-Wert von 6,0 gefunden. Der zeitliche Verlauf der enzymatischen Oxydation von $[4-^{14}\text{C}]17\beta\text{-Östradiol}$ zu $[4-^{14}\text{C}]\text{Östron}$ ist in Abbildung 2 dargestellt; es wurde ein stetiger Anstieg beobachtet, der jedoch nach 2stdg. Inkubationsdauer deutlich abflacht. Abbildung 3 zeigt, daß im Bereich von 0 - 0,5 ml Schwangerenserum Linearität zwischen der eingesetzten Enzympräparation und der Oxydation von $[4-^{14}\text{C}]17\beta\text{-Östradiol}$ zu $[4-^{14}\text{C}]\text{Östron}$ bestand.

Die Gleichgewichtskonstante für die Reaktion



wurde nach folgender Gleichung ermittelt:

$$K_H = \frac{[\text{Östron}] [\text{NADH}] [\text{H}^+]}{[17\beta\text{-Östradiol}] [\text{NAD}^+]}$$

Um das Gleichgewicht möglichst rasch zu erreichen, wurde die Reaktion mit 1,70 nMol $[4-^{14}\text{C}]\text{Östron}$ und 1,55 nMol $[4-^{14}\text{C}]17\beta\text{-Östradiol}$ gestartet. Unter den gewählten Versuchsbedingungen wurde das Gleichgewicht nach etwa 7 Stdn. erreicht (Abb. 4); die Gleichgewichtskonstante beträgt $18 \pm 3 \cdot 10^{-9}\text{m}$ bei 37° .

Die Abhängigkeit des Umsatzes von der Konzentration des Substrates ($[4-^{14}\text{C}]17\beta\text{-Östradiol}$) ist in Form der LINEWEAVER-BURK-Transformation in Abbildung 5 dargestellt. Bei einem pH-Wert von 8,6 beträgt der K_m -Wert für $17\beta\text{-Östradiol}$ $5,7 \cdot 10^{-6}\text{m}$.

Der Bestimmung der MICHAELIS-MENTEN-Konstanten, die für jedes Enzym unter definierten Bedingungen charakteristisch ist, liegen folgende Überlegungen zugrunde:

Die Geschwindigkeit v einer enzymatisch katalysierten Reaktion ist proportional der Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes ES:

$$v \sim [\text{ES}] \quad (1)$$

Mit steigender Substratkonzentration nimmt die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes zu. Sind alle Enzymmoleküle mit Substrat gesättigt, so hängt die maximale

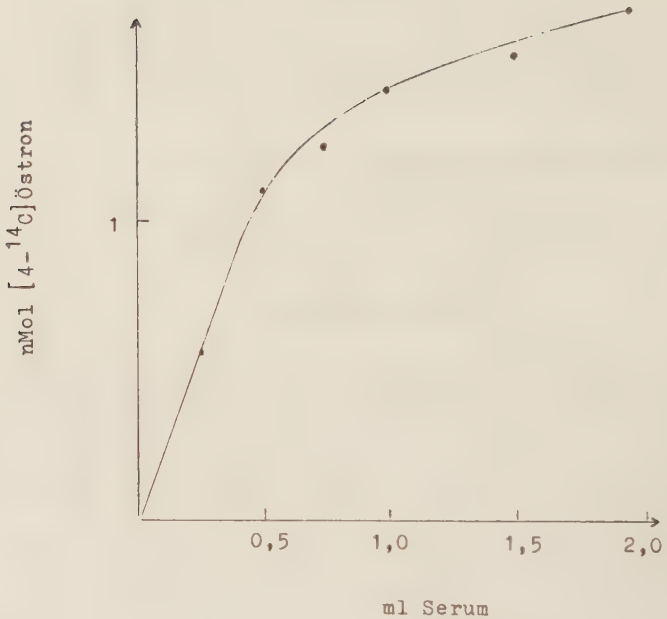


Abb. 3. Oxydation von $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol zu $[4-^{14}\text{C}]$ Östron durch die 17β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase im Serum der schwangeren Frau (10. Schwangerschaftsmonat) in Abhängigkeit von der eingesetzten Serummenge. Jeweils 3,1 nMol (100 nCi) $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol wurden mit steigenden Mengen Serum, 4,5 μMol NAD^+ und 0,2m Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) inkubiert; es wurde die Bildung von $[4-^{14}\text{C}]$ Östron gemessen. Alle Versuche wurden in 4,0 ml 120 Min. lang bei 37° durchgeführt. Die Punkte der Kurve sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

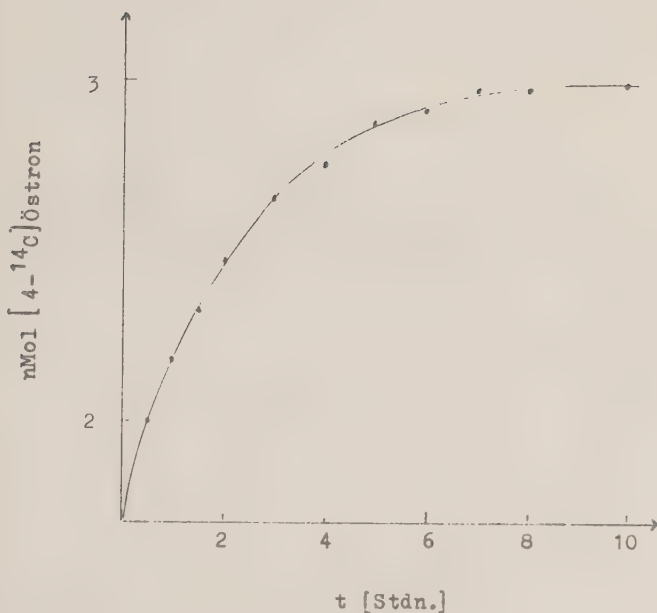
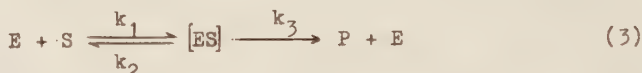


Abb. 4. Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung der Reaktion $17\beta\text{-Östradiol} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{Östron} + \text{NADH} + \text{H}^+$ durch die $17\beta\text{-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase}$ im Serum der schwangeren Frau (10. Schwangerschaftsmonat). 1,55 nMol (50 nC) $[4\text{-}^{14}\text{C}]17\beta\text{-Östradiol}$ und 1,70 nMol (50 nC) $[4\text{-}^{14}\text{C}]$ Östron wurden mit 1,0 ml Serum, 4,5 μMol NAD^+ , 4,5 μMol NADH und 0,2m Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) inkubiert; es wurde die Bildung von $[4\text{-}^{14}\text{C}]$ Östron gemessen. Alle Versuche wurden in 3,0 ml bei 37° durchgeführt. Die Punkte der Kurve sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Reaktionsgeschwindigkeit V nur noch von der Gesamtkonzentration $[T]$ des Enzyms ab:

$$V \sim [T] \quad (2)$$

Unter der Voraussetzung, daß die Reaktion nur in einer Richtung verläuft, kann sie folgendermaßen formuliert werden:



P ist das Produkt der Reaktion, k sind die Geschwindigkeitskonstanten. Im Fließgleichgewicht sind die Bildungsgeschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 \cdot [E] \cdot [S]$$

und seine Zerfallsgeschwindigkeit

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_2 \cdot [ES] + k_3 \cdot [ES]$$

gleich. Daraus folgt:

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = K_m \quad (4)$$

Wird mit $[T]$ die Gesamtkonzentration der Enzymmoleküle (freie und gebundene) bezeichnet, dann läßt sich die Konzentration der freien Enzymmoleküle ausdrücken durch

$$[E] = [T] - [ES] \quad (5)$$

Gleichung (5) in (4) eingesetzt ergibt

$$K_m = \frac{([T] - [ES]) \cdot [S]}{[ES]} = \frac{[T] \cdot [S]}{[ES]} - [S]$$

und nach ES entwickelt:

$$[ES] = \frac{[T] \cdot [S]}{[S] + K_m} \quad (6)$$

Mit $v \sim [ES]$ und $[T] \sim V$ nimmt obige Beziehung die Form

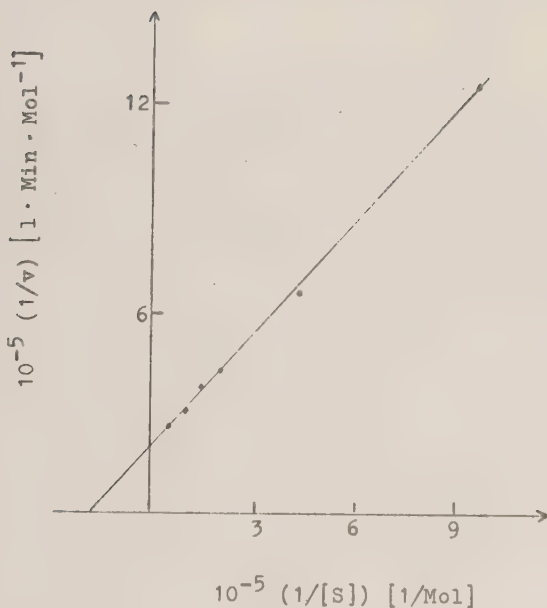


Abb. 5. Oxydation von $[4-^{14}\text{C}]17\beta\text{-Östradiol}$ zu $[4-^{14}\text{C}]$ Östron durch die $17\beta\text{-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase}$ im Serum der schwangeren Frau (10. Schwangerschaftsmonat) in Abhängigkeit von der Konzentration des Substrates. Steigende Mengen von inaktivem $17\beta\text{-Östradiol}$ sowie $3,1 \text{ nMol}$ (100 nC) $[4-^{14}\text{C}]17\beta\text{-Östradiol}$ wurden mit $1,0 \text{ ml}$ Serum, $4,5 \text{ } \mu\text{Mol}$ NAD^+ und $0,2\text{m}$ Tris-HCl-Puffer ($\text{pH } 8,6$) inkubiert; es wurde die Bildung von $[4-^{14}\text{C}]$ Östron gemessen. Alle Versuche wurden in $3,0 \text{ ml}$ 120 Min. lang bei 37° durchgeführt. Die Punkte der Kurve sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung an:

$$v = V \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (7)$$

Aus praktischen Gründen wird auf beiden Seiten der Gleichung (7) der Kehrwert gebildet.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V} \quad (8)$$

Diese von LINEWEAVER und BURK angegebene Transformation liefert eine einfache Funktion von der Form $Y = a X + b$. V wird gemessen; $[S]$ ist bekannt. In einem Koordinatensystem wird $1/v$ gegen $1/[S]$ aufgetragen. Für die Steigung $\text{tg } \alpha$ der Geraden gilt $\text{tg } \alpha = K_m/V$ (9). Sie wird bestimmt aus den Koordinaten zweier Punkte auf der Geraden.

$$\text{tg } \alpha = \frac{12,80 - 2,58}{9,71 - 0,56} = \frac{10,22}{9,15} = 1,12$$

Für $1/S = 0$ ist $1/v = 1/V$. $1/V$ ist Y-Achsenabschnitt. Sein Kehrwert beträgt $V = 0,51 \text{ [Mol/l} \cdot 10^{-5}]$.

Die Beziehung (9) wird nach K_m aufgelöst; die ermittelten Werte werden eingesetzt.

$$\begin{aligned} K_m &= \text{tg } \alpha \cdot V \\ &= 1,12 \cdot 0,51 \text{ [Mol/l} \cdot 10^{-5}] \\ &= 0,57 \text{ [Mol/l} \cdot 10^{-5}] \end{aligned}$$

Untersuchungen zur Substratspezifität

Um die Substratspezifität der im Serum der Schwangeren nachgewiesenen 17 β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase zu prüfen, wurden folgende Substrate mit dem Enzym inkubiert: $[4-^{14}\text{C}]$ Testosteron, $[4-^{14}\text{C}]17\alpha$ -Östradiol und $[4-^{14}\text{C}]$ Östriol unter oxydierenden Bedingungen (Cofaktor NAD^+ , pH 8,6); $[4-^{14}\text{C}]\Delta^4$ -Androstendion, $[4-^{14}\text{C}]$ Dehydroepiandrosteron und $[4-^{14}\text{C}]16$ -Oxo-17 β -Östradiol unter reduzierenden Bedingungen (Cofaktor NADH , pH 6,8). In allen Versuchen wurden die eingesetzten Substrate quantitativ wiedergefunden; es ergaben sich auch bei Erhöhung der Enzymmenge (2 - 5 ml Serum) keine Anhaltspunkte für

die Bildung von Oxydations- oder Reduktionsprodukten. Aus diesen Befunden geht hervor, daß die 17 β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase eine ausgeprägte Substratspezifität hat und die Anwesenheit einer 16-Oxogruppe die Reaktion zwischen Enzym und Substrat auch bei phenolischen Steroiden verhindert.

Versuche zur Aktivierung und Inaktivierung

Das Temperaturoptimum des Enzyms liegt bei 45°. Die Abhängigkeit der Oxydation von [4-¹⁴C]17 β -Östradiol zu [4-¹⁴C]Östron von der Temperatur im Bereich von 7 - 57° ist in Abbildung 6 wiedergegeben. Die Aktivierungsenergie des Enzyms beträgt unter den vorliegenden Versuchsbedingungen + 10,2 Kcal/Mol, die Inaktivierungsenergie -39,4 Kcal/Mol. Im Temperaturbereich von 27 - 37° wurde ein Q_{10} -Wert von 1,7, im Temperaturbereich 37 - 47° ein Q_{10} -Wert von 1,5 ermittelt. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse zur Aktivierung und Inaktivierung zusammengestellt. Keine der untersuchten Verbindungen hatte einen aktivierenden Einfluß auf die 17 β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase des Schwangerenserums. In Endkonzentrationen von 10^{-3} - 10^{-5} Mol/L wurden ausschließlich Hemmungen in unterschiedlichem Ausmaß beobachtet.

Aus Tabelle 2 geht hervor, daß die Aktivität des Enzyms in unbehandelten Seren rasch abnimmt; dies ist auch der Fall, wenn das Serum bei - 18° aufbewahrt wird. Offenbar ist die Schnelligkeit der Inaktivierung während der ersten 2 Stdn. bei den einzelnen Serumproben verschieden groß (vgl. Probe A und B).

Bei der Bestimmung der Aktivierungsenergie wird von folgenden Überlegungen ausgegangen:

Die Reaktion Östradiol-17 β $\rightleftharpoons$ Östron verläuft spontan nur sehr langsam infolge der großen Aktivierungsenergien A_1 und A_2 für die Hin- und Rückreaktion. Durch die enzymatische Katalyse werden die Aktivierungsenergien vermindert, wobei ihre Differenz ΔA , die freie Energie der Reaktion,

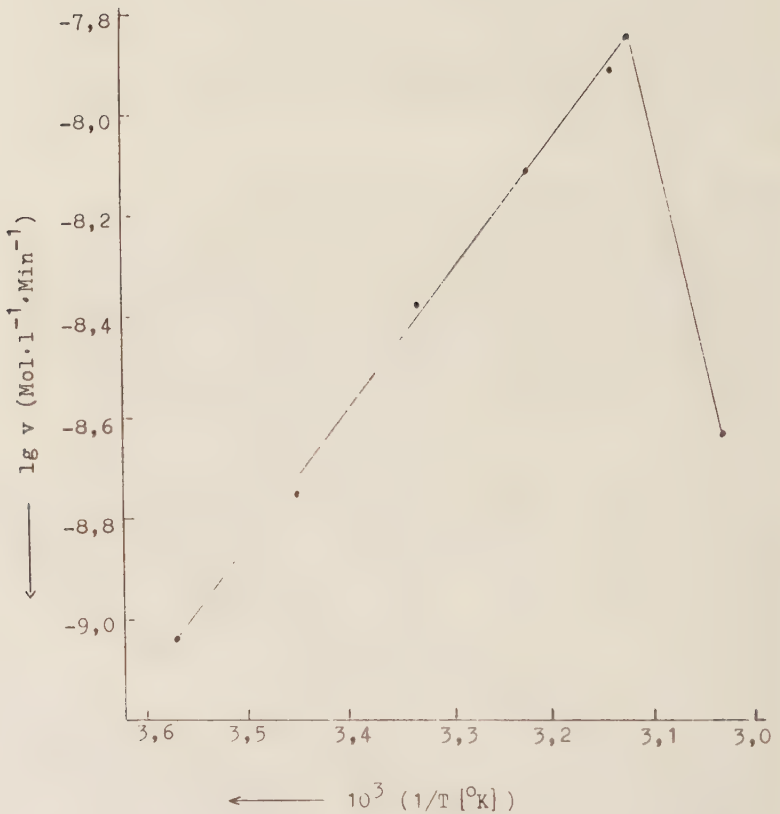


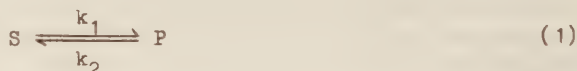
Abb. 6. Abhängigkeit der Oxydation von $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol zu $[4-^{14}\text{C}]$ Östron durch die 17β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase im Serum der schwangeren Frau (10. Schwangerschaftsmonat) von der Temperatur. Jeweils 10 nMol (320 nC) $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol wurden mit 1,0 ml Schwangerenserum, 4,5 μMol NAD^+ und 0,2m Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) inkubiert; es wurde die Bildung von $[4-^{14}\text{C}]$ Östron gemessen. Alle Versuche wurden in 3,0 ml 90 Min. lang durchgeführt. Die Punkte der Kurve sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Tab. 1. Wirkung verschiedener Substanzen auf die Oxydation von $[4-^{14}\text{C}]17\beta\text{-Östradiol}$ zu $[4-^{14}\text{C}]\text{Östron}$ durch die $17\beta\text{-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase}$ im Serum der schwangeren Frau (10. Schwangerschaftsmonat). Jeweils 3,1 nMol (100 nC) $[4-^{14}\text{C}]17\beta\text{-Östradiol}$ wurden mit 1,0 ml Schwangerenserum, 4,5 $\mu\text{Mol NAD}^+$ und 0,2m Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) inkubiert. Alle Versuche wurden in 3,0 ml 120 min. lang bei 37° durchgeführt.

Zugesetzte Verbindung	Endkonzentration [Mol/l]	Gebildete Menge $[4-^{14}\text{C}]\text{Östron}$ in nMol	Änderung gegenüber dem Kontrollwert [%]
keine	—	1,88	—
Jodessigsäure	10^{-3}	1,82	0
	10^{-5}	1,84	0
Jodacetamid	10^{-3}	1,67	- 11
	10^{-5}	1,80	0
o-Phenanthrolinhydrochlorid	10^{-3}	1,08	- 43
	10^{-5}	1,77	- 5
ZnCl_2	10^{-3}	0,39	- 79
	10^{-5}	1,84	0
HgCl_2	10^{-3}	0	-100
	10^{-4}	1,02	- 44
MgCl_2	10^{-3}	1,86	0
	10^{-5}	1,90	0
p-Chlormercuribenzoat	10^{-3}	0	-100
	10^{-5}	1,50	- 20

unverändert bleibt. Die Aktivierungsenergie ist unter gegebenen Bedingungen ein für das Enzym konstanter Wert.

In Gleichung (1) ist S das Substrat und P das Produkt; k_1 und k_2 sind Geschwindigkeitskonstanten; ihr Quotient $K = k_1/k_2$ wird Gleichgewichtskonstante genannt.



Die Änderung des Logarithmus naturalis der Gleichgewichtskonstanten mit der Temperatur T gehorcht der Beziehung (2). R ist allgemeine Gaskonstante.

$$\frac{\ln k_1/k_2}{dT} = \frac{A}{R \cdot T^2} \quad \text{bzw.} \quad (2)$$

$$\frac{\ln k_1}{dT} - \frac{\ln k_2}{dT} = \frac{A_1}{R \cdot T^2} - \frac{A_2}{R \cdot T^2}$$

Werden die Bedingungen so gewählt, daß die Reaktion mit linearer Geschwindigkeit von S nach P verläuft und die Rückreaktion unmeßbar klein ist, dann wird k_2 null und es folgt:

$$\frac{\ln k_1}{dT} = \frac{A_1}{R \cdot T^2}$$

Durch Integration ergibt sich die von ARRHENIUS zunächst empirisch gefundene Beziehung

$$\ln k = \frac{A}{R} \int T^{-2} = - \frac{A}{R \cdot T} + K_0 \quad (3)$$

Für $A = 0$ ist $K_0 = \ln k$, d.h. K_0 ist formal die Gleichgewichtskonstante unter der Voraussetzung, daß jeder Molekülstoß zur Reaktion führt. Da die Geschwindigkeitskonstante nicht gemessen wird, kann die ARRHENIUS-Gleichung nicht unmittelbar benutzt werden zur Bestimmung der Aktivierungsenergie.

Für die lineare Geschwindigkeit der Reaktion S nach P gilt:

$$v = k \cdot [ES], \quad \text{und logarithmiert:}$$

Tab. 2. Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase im Serum der schwangeren Frau (10. Schwangerschaftsmonat) in Abhängigkeit von der Dauer und der Temperatur der Aufbewahrung. Jeweils 3,1 nMol (100 nC) [4-¹⁴C]17 β -Östradiol wurden mit 1,0 ml Schwangerenserum, 4,5 μ Mol NAD⁺ und 0,2m Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) inkubiert. Alle Versuche wurden in 3,0 ml 120.Min. lang bei 37° durchgeführt. Das bei - 18° gehaltene Serum wurde in einzelnen Portionen eingefroren; diese wurden zu verschiedenen Zeitpunkten aufgetaut und zum Versuch verwendet.

Serumprobe	Aufbewahrungs- Temperatur vor Inkubation in °C	Dauer der Aufbewahrung in Stdn.	Gebildete Menge [4- ¹⁴ C] Östron in nMol	Änderung gegenüber dem Aus- gangswert [%]
A	+ 20	0	2,10	—
		2	1,49	- 29
		6	0,78	- 64
		22	0,09	- 96
		46	0	-100
B	+ 5	0	1,90	—
		5	0,37	- 80
		22	0,19	- 90
		120	0,07	- 96
		382	0	-100
	- 18	0	1,90	—
		5	0,58	- 69
		22	0,58	- 69
		120	0,47	- 75
		382	0,39	- 79
		990	0,37	- 80

$$\ln v = \ln k + \ln [ES] \quad (4)$$

Gleichung (4) in (3) eingesetzt liefert die endgültige Beziehung:

$$\ln v = - \frac{A}{R T} + K_0 + \ln [ES]$$

Es handelt sich um eine Funktion von der Form $Y = a X + b$. $Y = v$ wird gemessen. Somit kann $X = A$ aus der Steigung $1/RT$ der Geraden bestimmt werden. Die Werte sind Abbildung 6 zu entnehmen.

Fällung des Enzyms mit Ammoniumsulfat

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Durch Fällung mit Ammoniumsulfat konnte eine 3 - 4fache Anreicherung der 17 β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase bei etwa 50proz. Ausbeute erzielt werden. Die höchste spezifische Aktivität fand sich in der 40 - 60proz. Ammoniumsulfat-Fraktion.

Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase während der Schwangerschaft und unter der Geburt

Die Aktivität des Enzyms ist zu Beginn des 3. Schwangerschaftsmonates in 1 ml Serum mit Sicherheit nachweisbar; sie steigt mit zunehmender Schwangerschaftsdauer an und erreicht die höchsten Werte unmittelbar ante partum (Abb. 7). Der Mittelwert der Enzymaktivität (nMol [4-¹⁴C] Östron gebildet/ml Serum und 2 Stdn.) betrug zu diesem Zeitpunkt 1,98 bei Schwankungen von 1,74 bis 2,33 (8 Serumproben). Ein Teil der relativ großen Schwankungen kann durch die Instabilität des Enzyms erklärt werden. Unmittelbar post partum erfolgt ein starker Abfall der Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase; 18 Stdn. post partum ist im Serum mit der hier gewählten Versuchsanordnung keine Aktivität mehr nachweisbar (Abb. 8).

Tab. 3. Gesamtaktivitäten und spezif. Aktivitäten der 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase in verschiedenen Präparationen des Schwangerenserums (10. Schwangerschaftsmonat). Jeweils 3,1 nMol (100 nC) [4-¹⁴C]17 β -Östradiol wurden mit 0,5 ml der Enzympräparation, 4,5 μ Mol NAD⁺ und 0,2m Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) inkubiert. Alle Versuche wurden in 2,5 ml 60 Min. lang bei 37° durchgeführt. AS = Ammoniumsulfat. Weitere Einzelheiten siehe Methodik.

Präparation	Gebildete Menge [4- ¹⁴ C] Östron [nMol/0,5 ml u. Stde.]	Eiweiß- gehalt [mg/0,5 ml]	Gesamt- aktivität ⁺	Spezif. Aktivität ⁺⁺
Serum	0,217	38,0	5,21	5,7
40proz. AS- Fällung	0,326	35,5	1,39	9,2
60proz. AS- Fällung	0,620	31,5	2,48	19,7
80proz. AS- Fällung	0,170	32,8	0,68	5,2

$$^+\text{Gesamtaktivität} = \frac{\text{nMol Östron gebildet}}{\text{Stde.}}$$

$$^{++}\text{Spezif. Aktivität} = \frac{\text{nMol Östron gebildet}}{\text{Stde.} \cdot \text{mg Protein}}$$

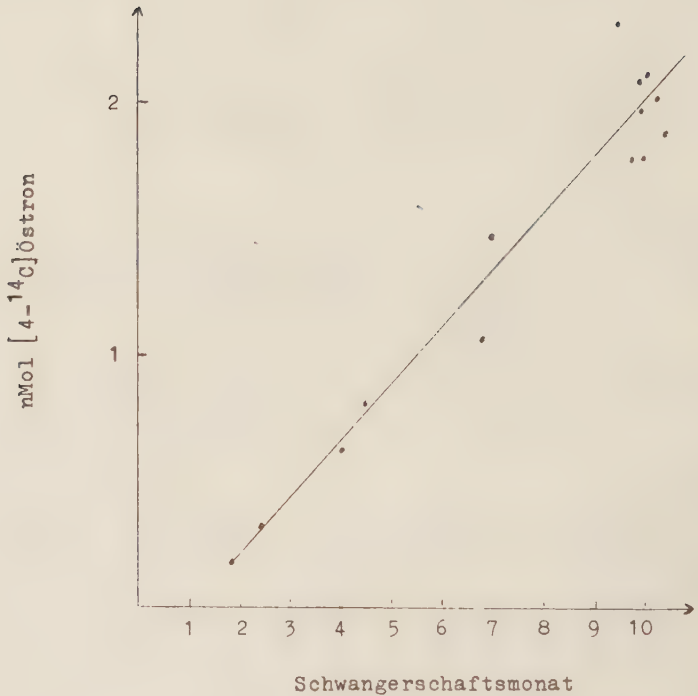


Abb. 7. Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase im Serum der schwangeren Frau in Abhängigkeit vom Schwangerschaftsmonat. Jeweils 3,1 nMol (100 nC) [4-¹⁴C]17 β -Östradiol wurden mit 1,0 ml Schwangerenserum, 4,5 μ Mol NAD⁺ und 0,2m Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) in einem Gesamtvolumen von 3,0 ml 120 Min. lang bei 37° inkubiert; es wurde die Bildung von [4-¹⁴C]Östron gemessen. Die Punkte der Kurve sind Mittelwerte aus Doppel- oder Dreifachbestimmungen.

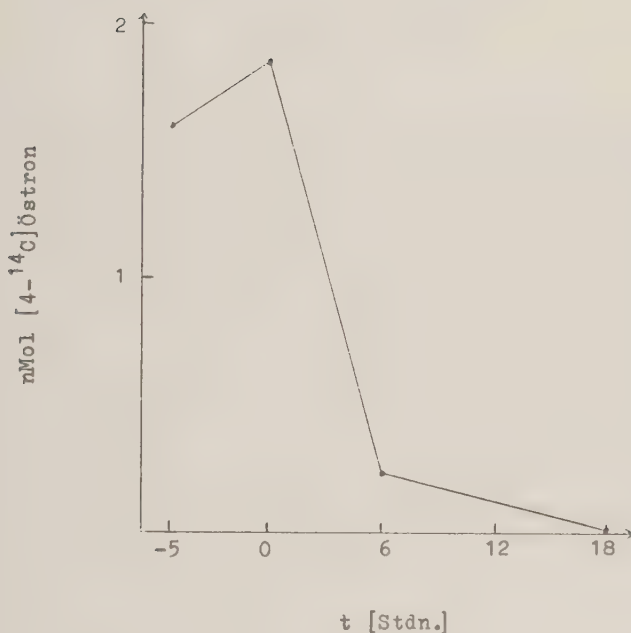


Abb. 8. Aktivität der 17β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase im Serum der schwangeren Frau unter der Geburt. Jeweils 3,1 nMol (100 nC) $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol wurden mit 1,0 ml Schwangerenserum, 4,5 μMol NAD^+ und 0,2m Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) in einem Gesamtvolumen von 3,0 ml 120 Min. lang bei 37° inkubiert; es wurde die Bildung von $[4-^{14}\text{C}]$ Östron gemessen. Die Punkte der Kurve sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Die Zeit 0 bezeichnet den Zeitpunkt zwischen der Entbindung des Kindes und der Lösung der Placenta.

DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß im Serum der schwangeren Frau ein Enzym vorkommt, welches 17 β -Östradiol zu Östron oxydiert und Östron zu 17 β -Östradiol reduziert; die Oxydoreduktion erfolgt sowohl mit NAD(H) als auch mit NADP(H) als Cofaktoren. Damit wurde unseres Wissens zum erstenmal ein Enzym des Steroidstoffwechsels im Serum des Menschen nachgewiesen. Die 17 β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase besitzt eine ausgeprägte Substratspezifität: Sie reagiert nach den bisher vorliegenden Befunden nur mit phenolischen C₁₈-Steroiden (17 β -Östradiol und Östron), nicht aber mit neutralen C₁₉-Steroiden (Testosteron und Δ^4 -Androstendion, Dehydroepiandrosteron). Darüber hinaus zeigt das Enzym auch eine deutliche Stereospezifität; 17 α -Östradiol, das biologisch inaktive Isomere von 17 β -Östradiol, wird nicht angegriffen. Diese Feststellung sowie die Tatsache, daß die Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase im Verlaufe der Schwangerschaft zunimmt, ihre höchsten Werte unmittelbar ante partum erreicht und etwa 18 Std. post partum nicht mehr nachweisbar ist, sprechen für den placentaren Ursprung des Enzyms. Wie oben erwähnt, verfügt nämlich die Placenta des Menschen über eine sehr aktive 17 β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase - auch als Östradiol-17 β -Dehydrogenase bezeichnet (6, 7). Das Placentaenzym reagiert ebenfalls nur mit der 17 β -Hydroxygruppe von 17 β -Östradiol und ist gegenüber 16-Oxo-17 β -Östradiol und Testosteron genau so inaktiv (7) wie das Serumenzym. Es liegt demnach nahe anzunehmen, daß die placentare 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase aus dem Gewebe in das Blut übertritt und somit im Serum der Schwangeren nachgewiesen werden kann.

Die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen liefern weitere Hinweise für die placentare Herkunft des hier beschriebenen Serumenzyms. Die MICHAELIS-MENTEN-Konstanten für 17 β -Östradiol betragen beim placentaren Enzym $4,5 \cdot 10^{-6} \text{ m}$ (7) und beim Serumenzym $5,7 \cdot 10^{-6} \text{ m}$. Beide 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktasen reagieren sowohl mit NAD(H) als auch mit NADP(H), wobei allerdings geringfügige quantitative Unterschiede bestehen. So wird Östron durch das Serumenzym in Gegenwart von NADPH schneller reduziert als in Gegenwart von NADH; das hochgereinigte placentare Enzym verhält sich umgekehrt(5). Dagegen wurde für die Oxydation von 17 β -Östradiol durch die 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase des Serums - ähnlich wie mit dem hochgereinigten Placentaenzym (5) - ein nur etwas höherer Umsatz mit NAD $^{+}$ als mit NADP $^{+}$ beobachtet, während das weniger gereinigte Placentaenzym (6) mit NAD $^{+}$ einen doppelt so großen Umsatz zeigte. Diese geringen Unterschiede dürften durch die verschiedenen Reinheitsgrade der Enzympräparation bedingt sein.

Wie zu erwarten war und in Übereinstimmung mit dem Verhalten der placentaren 17 β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase wird die Aktivität des Serumenzyms durch SH-Gruppen blockierende Substanzen, wie z.B. Jodacetamid, o-Phenanthrolinhydrochlorid, Zink- und Quecksilberionen sowie p-Chlormercuribenzoat, gehemmt; eine Aktivierung des Serumenzyms durch geringe Konzentrationen von Zinkionen konnte allerdings nicht beobachtet werden.

Charakteristisch für die 17 β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase des Serums ist ihre außergewöhnliche Instabilität. Auch durch Fällung des Enzyms mit Ammoniumsulfat und Aufnahme der so gewonnenen Enzympräparation in einem glycerinhaltigen Medium konnte eine Inaktivierung nicht verhindert werden. Aus diesem Grunde besitzen die Angaben, die in der vorliegenden Arbeit über die spezifischen Aktivitäten in den einzelnen Ammoniumsulfat-Fractionen gemacht werden, nur einen relativen Wert; dies ist durch die Tatsache bedingt, daß die Aktivitätsmessungen infolge des

unvermeidlichen Zeitverlustes bei der Ammoniumsulfat-Fällung frühestens 7 - 8 Stdn. nach Entnahme des Blutes durchgeführt werden konnten. Es ließ sich jedoch zeigen, daß die höchste spezifische Aktivität des Serumenzym in der 40 - 60proz. Ammoniumsulfat-Fällung vorhanden ist. Auch das Placentaenzym wird durch Halbsättigung des Homogenat-Überstandes mit Ammoniumsulfat angereichert (5, 6). Wie bereits erwähnt, wird eine Inaktivierung der 17 β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase des Serums - im Gegensatz zum placentaren Enzym - durch Zusatz von Glycerin nicht verhindert. Dagegen hat 17 β -Östradiol offenbar einen stabilisierenden Effekt, wie er im übrigen auch für das Placentaenzym angegeben worden ist (5, 6). Diese Schlußfolgerung kann aus den Ergebnissen der längerdauernden Inkubationsversuche (Zeit-Umsatz-Kurve, Bestimmung der Gleichgewichtseinstellung) gezogen werden: Erfolgte nämlich die Inkubation des Serums unmittelbar nach Gewinnung des Blutes mit 17 β -Östradiol, so lagen die Enzymaktivitäten - unter Berücksichtigung des Zeitpunktes der Schwangerschaft - stets in der gleichen Größenordnung. Aus dem Gesagten ergibt sich, daß vergleichende Untersuchungen über die Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase des Serums während der Schwangerschaft nur unter streng standardisierten Bedingungen durchgeführt werden können.

Wegen ihrer relativ geringen spezifischen Aktivität stellt die 17 β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase das Gleichgewicht zwischen oxydierter und reduzierter Verbindung wesentlich langsamer ein als entsprechende Enzyme bakteriellen Ursprungs. Unter den hier gewählten Versuchsbedingungen wurde das Gleichgewicht erst nach etwa 7 Stdn. erreicht; die Gleichgewichtskonstante K_H des Serumenzym beträgt bei 37° $18 \pm 3 \cdot 10^{-9}m$ und entspricht damit derjenigen der 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase der menschlichen Placenta (6). Die Übereinstimmung der Gleichgewichtskonstanten ist insofern erstaunlich, als die Messung von Gleichgewichten stark durch die Reinheit der verwendeten Enzympräparation beeinflusst wird (30, 31). Das Temperaturop-

timum der im Schwangerenserum nachgewiesenen 17 β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase ist mit 45° relativ hoch. Die Aktivierungsenergie des Enzyms beträgt + 10,2 Kcal/Mol und liegt damit in der Größenordnung für Oxydoreduktasen. Die vorliegenden Ergebnisse lassen keinen Zweifel daran, daß die 17 β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase im Serum schwangerer Frauen aus der Placenta stammt und in ihren enzymkinetischen Eigenschaften weitestgehend mit der placentaren 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase (Östradiol-17 β -Dehydrogenase) identisch ist. Das Verhalten der Enzymaktivität während der Schwangerschaft sowie kurz vor und nach der Geburt läßt den Schluß zu, daß durch Bestimmung des Serumenzyms Rückschlüsse auf den Funktionszustand der foeto-placentaren Einheit ermöglicht werden. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um festzustellen, welche Bedeutung der Aktivitätsbestimmung der 17 β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase im Schwangerenserum für die klinisch-chemische Diagnostik zukommt.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Im Serum der schwangeren Frau wurde eine 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase nachgewiesen, die eine ausgeprägte Substratspezifität besitzt und nur mit phenolischen, nicht aber mit neutralen Steroiden reagiert; darüber hinaus zeigt das Enzym eine Stereospezifität für die 17 β -Hydroxygruppe. Die 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase oxydiert [4-¹⁴C]17 β -Östradiol zu [4-¹⁴C]Östron in Gegenwart von NAD⁺ etwas schneller als in Gegenwart von NADP⁺; bei der Reduktion von [4-¹⁴C]Östron zu [4-¹⁴C]17 β -Östradiol wurden mit NADPH größere Umsätze beobachtet als mit NADH. Das Optimum der Oxydation der 17 β -Hydroxygruppe liegt bei einem pH-Wert von 9,0, das Optimum der Reduktion der 17-Oxogruppe bei einem pH-Wert von 6,0. Die MICHAELIS-MENTEN-Konstante beträgt bei einem pH-Wert von 8,6 für 17 β -Östradiol $5,7 \cdot 10^{-6}$ m. Das Enzym hat ein Temperaturoptimum bei 45°; für die Aktivierungsenergie wurde ein Wert von + 10,2 Kcal/Mol ermittelt. Die Q_{10} -Werte schwanken zwischen 1,5 und 1,7. Die Gleichgewichtseinstellung zwischen 17 β -Östradiol und Östron ist nach etwa 7 Stdn. erreicht; die Gleichgewichtskonstante K_H hat einen Wert von $18 \pm 3 \cdot 10^{-9}$ m. Durch Zusatz von SH-Gruppen blockierenden Verbindungen wird die Aktivität des Enzyms gehemmt. Die 17 β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase des Serums kann durch Fällung mit Ammoniumsulfat 3 - 4fach bei einer 50proz. Ausbeute angereichert werden. Die höchste spezifische Aktivität findet sich in der 40proz. Ammoniumsulfat-Fraktion. Sowohl das im Serum befindliche Enzym als auch die mit Ammoniumsulfat gefällte Enzympräparation werden schnell inaktiviert; Glycerin hat keinen stabilisierenden Einfluß, wohl aber der Zusatz von 17 β -Östradiol.

Die Aktivität des Serumenzyms nimmt vom 3. - 10. Schwangerschaftsmonat um etwa das 10fache zu und ist 18 Stdn. post partum nicht mehr nachweisbar. Dieses Verhalten und die übrigen enzymkinetischen Untersuchungen zeigen, daß die im Serum der Schwangeren nachgewiesene 17 β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase placentaren Ursprungs und mit der in der Placenta des Menschen nachgewiesenen 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase (Östradiol-17 β -Dehydrogenase) weitgehend identisch ist.

Herrn Professor Dr. H. Breuer danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und für die verständnisvolle Geduld und Hilfe, die er mir zuteil werden ließ.

Desgleichen gilt mein Dank Herrn Dr. J. Breuer für seine Hilfe und Anregungen.

Der Universitäts-Frauenklinik in Bonn bin ich für die Beschaffung der Serumproben sehr zu Dank verpflichtet.

L E B E N S L A U F

Am 30. Mai 1943 wurde ich, Walther Meusers, geboren in Viersen als zweites Kind des Kaufmanns Dr. phil. Carl Meusers und seiner Frau Gertrud geb. Mießen.

Von 1950 bis 1963 besuchte ich die Freie Waldorfschule in Krefeld, eine einheitliche Volks- und Höhere Schule, an der mir am 4. März 1963 das Zeugnis der Reife zuerkannt wurde.

Im Sommersemester desselben Jahres begann ich das Studium der Medizin an der Universität in Bonn. Die ärztliche Vorprüfung legte ich ab am 29. Oktober 1965.

Im Wintersemester 1966 begann ich die vorliegende Promotionsarbeit bei Herrn Professor Dr. H. Breuer, die ich Ostern 1967 abschloß.

Das Studium der Medizin beendete ich am 6. Februar 1969 mit der ärztlichen Prüfung.

